

Petra Šarenić

# Određivanje ukupnih polifenola i antioksidativne aktivnosti u maslinovom ulju

## DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2018.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Analitika u razvoju farmaceutskih proizvoda Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova pod stručnim vodstvom dr. sc. Daniele Amidžić Klarić. Izradu ovog diplomskog rada financirala je Zaklada Adris.

*Iznimno sam zahvalna što sam imala priliku surađivati i učiti od mentorice dr. sc. Daniele Amidžić Klarić. Zahvaljujem joj se na podršci, pozitivnosti, ugodnoj atmosferi tijekom izvođenja eksperimentalnog dijela rada i puno uloženog vremena.*

*Također, zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Ani Mornar Turk, voditeljici projekta „Razvoj novih analitičkih metoda kao preduvjet proizvodnje visoko kvalitetnog i ekološki dobivenog maslinovog ulja“, koji je financirala Zaklada Adris.*

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. MASLINOVO ULJE .....	2
1.1.1. Kemijski sastav maslinovog ulja .....	2
1.1.2. Utjecaj maslinovog ulja na zdravlje .....	3
1.2. POLIFENOLI .....	5
1.2.1. Utjecaj polifenola na zdravlje .....	5
1.2.2. Analitičke metode za određivanje polifenola u maslinovom ulju .....	7
1.3. ANTIOKSIDANSI .....	9
2. OBRAZLOŽENJE TEME .....	11
3. MATERIJALI I METODE .....	13
3.1. MATERIJALI .....	14
3.1.1. Kemikalije .....	14
3.1.2. Uzorci .....	14
3.1.3. Radni instrumenti .....	14
3.1.4. Pribor .....	14
3.1.4. Programski paketi .....	14
3.2. METODE .....	15
3.2.1. Priprema standardnih otopina .....	15
3.2.2. Ekstrakcija polifenola metodom tekuće- tekuće .....	15
3.2.3. Spektrofotometrijska metoda za određivanje ukupnih polifenola .....	16
3.2.4. Određivanje antioksidativne aktivnosti DPPH metodom .....	16
3.2.5. Statistička obrada podataka .....	17
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	18
4.1. SADRŽAJA UKUPNIH POLIFENOLA U MASLINOVOM ULJU .....	19
4.2. PROCJENA ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI MASLINOVOG ULJA .....	22
5. ZAKLJUČAK .....	26
6. LITERATURA .....	28
7. SAŽETAK/SUMMARY .....	31

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/ BASIC DOCUMENTATION CARD

## **1. UVOD**

## 1.1. MASLINOVO ULJE

Maslinovo ulje dobiva se mehaničkom ekstrakcijom ploda stabla masline (*Olea europea* L. = *O. sativa* (Hoffmg. et Lk.) Fiori, *Oleaceae*). Ulje se u plodu počinje stvarati tijekom sazrijevanja, te dostiže najveću količinu u trenutku kada maslina dostigne svoju najintenzivniju boju koja ovisno o sorti masline može biti od svijetlo zelene do tamno ljubičaste ([www.dignano.wordpress.com](http://www.dignano.wordpress.com)). Osim na mediteranskom području, karakteristike koje obogaćuju okus mnogih jela te pozitivan učinak maslinovog ulja na zdravlje uvelike su prepoznati u svim dijelovima svijeta.

### 1.1.1. Kemijski sastav maslinovog ulja

Maslinovo ulje sastavljeno je od osapunjivog dijela (99%), a samo 1% otpada na neosapunjivi dio. Najveći dio osapunjivog dijela čine trigliceridi, odnosno određene masne kiseline u njihovom sastavu. Sadržaj masnih kiselina oscilira ovisno o nizu čimbenika poput sorte masline, stupnju zrelosti ploda, nadmorske visine, klime. Budući da udio pojedinih masnih kiselina može varirati Međunarodno vijeće za maslinovo ulje (engl. *International Olive Oil Council*, IOOC) odredilo je granične vrijednosti (Žanetić i Gugić, 2006):

Palmitinska kiselina (16:0) 7,5 – 20,0%

Palmitoleinska kiselina (16:1, n-7) 0,3 – 3,5%

Stearinska kiselina (18:0) 0,5 – 5,0%

Oleinska kiselina (18:1 n-9) 55,0 – 83,0%

Linolna kiselina (18:2 n-6) 3,5 – 21,0%

$\alpha$ -linolenska kiselina (18:3 n-3) 0,0 – 1,5%.

Iz navedenih vrijednosti vidljivo je da kvalitetno maslinovo ulje sadrži izuzetno visok udio jednostruko nezasićene oleinske kiseline, znatnu količinu esencijalnih masnih kiselina (linolne i  $\alpha$ -linolenske kiseline) te umjerenu količinu zasićenih masnih kiselina poput stearinske i palmitinske kiseline. Upravo takav sastav i omjer masnih kiselina čini maslinovo ulje vrjednijim od drugih jestivih ulja (Žanetić i Gugić, 2006).

Sastavnice neosapunjivog dijela maslinovog ulja imaju ključnu ulogu u mnogim fiziološkim procesima. To su uglavnom produkti metabolizma biljke. Neki od ovih sastavnica ulja imaju terapijski učinak, drugi predstavljaju osnovni element arome ulja (mirisi, okusi), a velika skupina spojeva su djelotvorni prirodni antioksidansi, koji povećavaju otpornost ulja na

kvarenje. Najzastupljenija skupina spojeva neosapunjive frakcije čine ugljikovodici (60%) među kojima dominira skvalen (60-70%). Skvalen je antioksidans i važan biokemijski prekursor sterola. Od drugih važnih sastavnica izdvajaju se tokoferoli, prirodni antioksidansi, koji usporavaju oksidacijsko kvarenje ulja. Najzastupljeniji predstavnik ove skupine spojeva je  $\alpha$  – tokoferol (vitamin E). Od brojnih sterola u neosapunjivom dijelu najvažniji je  $\beta$ -sitosterol. Njegova važnost leži u inhibiciji apsorpcije viška kolesterola u crijevima. Steroli, poput tokoferola, imaju antioksidativnu aktivnost. Zelena boja maslinovog ulja potječe od više vrsta pigmenta klorofila koji imaju dvojaku ulogu. Na svjetlosti induciraju oksidaciju, a u mraku djeluju kao antioksidansi. Osim navedenog, u neosapunjivom dijelu nalaze se fenolni spojevima koji su detaljnije opisani u poglavlju 1.2., karotenoidi od kojih su najvažniji  $\beta$ -karoten, likopen i oksidirani derivati karotena, zatim alifatski alkoholi koji su važni za sintezu sterola te spojevi koji daju aromu ulju. U dostupnoj literaturi može se pronaći preko 90 tzv. *'spojeva arome'*, a odnose se na aldehide, ketone, estere itd (Žanetić i Gugić, 2006).

Sastav maslinovog ulja ovisi o brojnim čimbenicima. Neki od njih su razina zrelosti ploda, sorta, tlo, lokacija, sustav navodnjavanja, varijacije u procesu proizvodnje, godina uzgoja, vrijeme žetve te drugi okolišni čimbenici. Na sastav masnih kiselina uvelike utječe razina zrelosti ploda masline. Period od 60. do 75. dana od početka procesa zrenja pokazao se kao optimalan i u njemu je sadržaj ulja u plodu masline najveći. Sadržaj ulja u plodu masline utječe na: količinu ukupnih polifenola, koncentraciju klorofila te palmitinske i linolenske kiseline u maslinovom ulju. Povećanje razine masnih kiselina sazrijevanjem povezuje se s povećanjem aktivnosti lipolitičkog enzima i smanjenjem aktivnosti enzima lipooksigenaze. S druge strane, kod polifenolnih sastavnica proces je drugačiji. U dostupnoj literaturi opisan je niz slučajeva u kojima je došlo do postupnog i značajnog smanjenja sadržaja polifenolnih tvari u maslinovom ulju dobivenom od kasnije žetve. Također, osjetilne značajke kao što su okus, miris i boja degradirale su s kasnijom žetvom (Alowaiesh i sur., 2018).

### **1.1.2. Utjecaj maslinovog ulja na zdravlje**

Mediteranska prehrana je bogata ribom, povrćem, voćem, žitaricama te maslinovim uljem kao glavnim izvorom masti. Ključna uloga u preventivnom i terapijskom djelovanju ekstra djevičanskog maslinovog ulja na zdravlje jest optimalan omjer nezasićenih i zasićenih masnih kiselina te antioksidativna aktivnost polifenola, tokoferola, karotenoida i klorofila. Također treba istaknuti značajnu ulogu biljnog sterola  $\beta$ -sitosterola koji inhibira apsorpciju kolesterola i time pridonosi sniženju povišene razine kolesterola ([www.vitamini.hr](http://www.vitamini.hr)).

Maslinovo ulje pruža zaštitu od niza degenerativnih bolesti kao što su ateroskleroza, karcinom debelog crijeva, astma, šećerna bolest i artritis. Iako se povećana konzumacija masti povezuje s razvojem takvih bolesti, na mediteranskom području unatoč visokom unosu masti smanjena je pojavnost degenerativnih bolesti. Razlogu tomu je što je maslinovo ulje glavni izvor masti na Mediteranu. U dostupnoj znanstvenoj i stručnoj literaturi mogu se naći brojni primjeri o pozitivnom učinku mediteranskog načina prehrane na manji rizik od smrtnosti ([www.vitamini.hr](http://www.vitamini.hr)).

Maslinovo ulje pokazuje pozitivan učinak na krvožilni sustav. Visok udio oleinske kiseline i prisustvo antioksidansa uvjetuju zaštitu dobrog HDL kolesterola i smanjenje lošeg LDL kolesterola. Rezultati provedenih studija pokazali su da oleinska kiselina i antioksidansi inhibiraju oksidaciju LDL kolesterola, a posljedično i nastanak ateroskleroze ([www.vitamini.hr](http://www.vitamini.hr)).

Nadalje, maslinovo ulje pozitivno utječe i na regulaciju krvnog tlaka. Zaključak provedenih istraživanja je da mediteranska kuhinja snižava povišeni krvni tlak i tome najviše pridonosi upravo maslinovo ulje ([www.vitamini.hr](http://www.vitamini.hr)).

Nadalje, maslinovo ulje smanjuje rizik od nastanka karcinoma, pogotovo karcinom dojke i kolona. Rezultati istraživanja u kojem su sudjelovale žene s Kanarskog otočja pokazali su da ispitivana skupina žena koje su konzumirale najviše jednostruko nezasićenih masnih kiselina imala čak 48 % manji rizik od razvoja karcinoma dojke u usporedbi sa ženama čiji je unos tih kiselina bio najmanji ([www.vitamini.hr](http://www.vitamini.hr)).

Mediteranski režim prehrane izuzetno je koristan i za dijabetičare. Znanstvena studija je pokazala da takav način prehrane bogat maslinovim uljem povećava osjetljivost na inzulin i time pozitivno djeluje na regulaciju glukoze u krvi ([www.vitamini.hr](http://www.vitamini.hr)).

Ekstra djevičanskog maslinovog ulja inhibira rast bakterije *Helicobacter pylori*, uzročnika peptičkog ulkusa, a polifenolne sastavnice stabilni su i u kiselom okolišu kao što je želudac gdje ispoljavaju antibakterijsku aktivnost ([www.vitamini.hr](http://www.vitamini.hr)).

Protuupalnim učincima maslinovog ulja pridonosi oleinska kiselina koja inhibira sintezu upalnih medijatora, te antioksidansi i oleokantal. Zanimljivo je za istaknuti da oleokantal osim protuupalnog djelovanja ispoljava i analgetsko djelovanje. Unos 50 g maslinovog ulja dnevno ekvivalentno je desetini doze analgetika koja se preporučuje odraslim osobama ([www.vitamini.hr](http://www.vitamini.hr)).

## 1.2. POLIFENOLI

Polifenoli su biološki aktivne tvari, a nastaju kao produkti sekundarnog metabolizma biljaka. Voće, povrće, žitarice, orašasti plodovi, sjemenke te napitci kava, čaj i vino izvor su polifenola (Gorzynik-Debicka i sur., 2018).

Oni mogu biti različite strukture. Strukturu čine jedan ili više aromatskih prstenova na kojima su vezane hidroksilne skupine (Gorzynik-Debicka i sur., 2018). U djevičanskom maslinovom ulju nalazimo fenolne kiseline i njihove derivate (kumarinska, galna, kavena, protokatehinska kiselina, p-hidroksibenzojeva, ferulična, cimetna i benzojeva kiselina), fenolne alkohole (hidroksitirozol i tirozol), sekoiridoide (derivati elenolne kiseline, aglikon oleuropeina, aglikon ligstrozida, oleuropein), lignane i flavonoide (apigenin i luteolin) (Servili i Montedoro, 2002).

### 1.2.1. Utjecaj polifenola na zdravlje

Polifenoli, kao prirodni antioksidansi, osim sposobnosti gašenja radikala pokazuju puno širi značaj u zaštiti organizma. Upravo iz tog razloga postali su predmet istraživanja diljem svijeta. Širok medicinski značaj sastoji se u vazodilatatornom, antihipertenzivnom, hipoglikemijskom te antimikrobnom učinku. Zbog nekih od navedenih značajki zaslužili su i mjesto u Europskoj farmakopeji poput 80%-tnog alkoholnog ekstrakta listova masline koji sadrži cijeli niz fenolne tvari: oleuropein, hidroksitirozol, kavena kiselina, tirozol, apigenin i verbaskozid (Rigacci i Stefani, 2016).

S obzirom na širok spektar različitih pozitivnih učinaka polifenola, lako je zaključiti da je za to odgovorno više različitih mehanizama, a ne samo jedan. Jedan od otkrivenih mehanizama kojima polifenoli djeluju pozitivno na zdravlje je aktivacija AMPK (proteinska kinaza aktivirana AMP-om) posredstvom aglikona oleuropeina u prisutnosti kalcija. Budući da je molekula AMPK je uključena u više patofizioloških i fizioloških puteva kao što su npr. katabolizam, anabolizam, upala, neurodegeneracija, apoptoza, proliferacija stanica smatra se da upravo u tom mehanizmu djelovanja leži objašnjenje mnogih pleiotropnih učinaka polifenola (Rigacci i Stefani, 2016).

Nadalje, polifenoli, iako su antioksidansi, u nekim uvjetima imaju blago prooksidativno djelovanje. Premda se dobiva dojam kao oksimoron, time polifenoli pomažu u održavanju redoks ravnoteže stanice koja je važna i ima zaštitnu ulogu. Tako hidroksitirozol u prisustvu peroksidaza može ući u redoks ciklus koji će generirati superoksidge koji će inducirati



ekspresiju MnSOD (mangan-superoksid dismutaza), enzima potrebnog za normalan život stanice (Rigacci i Stefani, 2016).

Pretpostavlja se kako je jedan od mehanizam kojim polifenoli ispoljavaju pozitivne učinke interakcija i neposredno formiranje nekovalentnih veza s drugim aromatskim prstenima te da na taj način ekstra djevičansko maslinovo ulje inhibira toksičnu agregaciju amiloida (Rigacci i Stefani, 2016).

Različiti farmakokinetički procesi utječu na količinu apsorbiranih polifenola koji će ući u krvi i ispoljiti svoje djelovanje. Zbog nepotpune apsorpcije, metabolizma mikrobiote i biotransformacije u tkivu i biljci oralna bioraspoloživost polifenola je smanjena. Unatoč tome, polifenoli su dobro raspodijeljeni u organizmu, a nalaze se i u mozgu gdje također pozitivno utječu na patološke procese (Rigacci i Stefani, 2016).

Poznato je da reaktivni kisikovi spojevi (ROS) sudjeluju u razvoju tumora, ateroskleroze i neurodegenerativnih bolesti. Polifenoli svojom sposobnošću gašenja slobodnih radikala ispoljavaju zaštitni učinak na stanice. Važno je naglasiti da kombinacija različitih antioksidansa s različitim mehanizmima djelovanja znatno snažnije doprinosi smanjenom riziku od nastanka karcinom nego unos pojedinačnog antioksidansa. Osim što je uz takvu kombinaciju korist veća, rizik od razvoja toksičnih reakcija je manji. Također, polifenoli su se, kao i druge fitokemikalije, pokazali učinkovitijima ukoliko ih unosimo putem prirodnih izvora kao što su voće i povrće nego ako ih uzimamo u obliku suplemenata. Zanimljiv je istaknuti kako je pokazano da kombinacija određenog voća ima značajno manju efektivnu koncentraciju antioksidansa. Koncentracija antioksidansa potrebna za učinak koji odgovara 50% od maksimalnog učinka (EC50) pokazala se čak pet puta nižom prilikom mjerenja antioksidativne aktivnosti *in vitro* kombinacije jabuke, naranče, grožđa i borovnice u odnosu na EC50 samo jedne vrste voća. Razlog tome je sinergistički učinak što znači da jedan antioksidans potencira djelovanje drugog i ukupni učinak je veći nego što bi bio kada bi zbrojili učinke pojedinačnih antioksidansa. U prilog sinergističkom učinku ide i slijedeći primjer. Ekstrakt crnog čaja, kofein i narančina kora međusobno pojačavaju svoja djelovanja i uspješno sprječavaju razvoj pretilosti na način da stimuliraju termogenezu i simpatički sustav, smanjuju apetit i smanjuju stvaranje masnog tkiva. Epigalokatehin-galat (EGCG), glavni polifenol zelenog čaja konjugacijom s dokozoheksaenoičnom kiselinom (DHA) stvara spoj koji može spriječiti rak debelog crijeva. Osim što pomaže u prevenciji pretilosti, narančina kora sadrži polimetoksiflavone, polifenole koji ispoljavaju protuupalno, antivirusno, antitrombotsko, antiaterogeno i protukarcinogeno djelovanje. Najznačajniji polifenol maslinovog ulja, hidroksitirozol zaslužan je za više terapijskih učinaka. Jedan od njih je

smanjenje rizika od razvoja kardiovaskularnih bolesti. Pretpostavlja se da hidroksitirozol ulazi u stanicu i tamo inhibira sintezu leukotriena B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) i inhibira agregaciju trombocita. Također, zabilježeno je da visok unos soje i njenih izoflavona ima preventivan učinak na razvoj osteoporoze, više vrsta karcinoma, menopauze i srčanih bolesti. Zbog slične strukture izoflavoni iz soje mogu aktivirati estrogenske receptore, a čini se da je upravo taj mehanizam temelj blagotvornog učinka soje na zdravlje. Značajnu terapijsku ulogu ima i resveratrol. Još 1990-ih uočeno je protektivno djelovanje crvenog vina na srce. Pokazalo se da je za takav učinak odgovoran upravo resveratrol. Također, pomaže pacijentima s dijabetesom tip 2, neurodegenerativnim bolestima i rakom. Potencijalno bi se mogao koristiti u terapiji pretilosti budući da je zabilježen njegov učinak na smanjenje tjelesne mase. Mehanizam je povećana ekspresija gena koji kodiraju proteine važne za funkcije mitohondrija i na taj način povećana apoptoza adipocita, a posljedično i smanjenje masnog tkiva.

Iz svega navedenog jasno je zašto su polifenoli izrazito istraživane i cijenjene fitokemikalije. Polifenoli su pokazali brojna svojstva koja pomažu u prevenciji mnogih bolesti. Uz antioksidativno djelovanje veže se i kardioprotektivno, vazodilatatorno, protuupalno, antimikrobno, protualergijsko i antitrombotsko djelovanje (Shahidi and Ambigaipalan, 2015).

### **1.2.2. Analitičke metode za određivanje polifenola u maslinovom ulju**

Analitičke tehnike koje se koriste za kvantifikaciju polifenola su slijedeće:

HPLC (tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti, engl. *High-Performance Liquid Chromatography*) je oblik kromatografije gdje se sastavnice uzorka odjeljuju na principu različitog afiniteta analita za stacionarnu i mobilnu fazu, a mobilna je faza tekuća. U razvijenim metodama koriste se različiti detektori poput DAD (detektor s nizom dioda, engl. *Diode-Array Detector*), ECD (elektrokemijski detektor, engl. *Electrochemical detector*) i MS (maseni detektor, engl. *Mass Spectrometry Detector*). Iako su DAD i MS najčešće korišteni detektori ECD se pokazao kao dobra analitička tehnika, budući da omogućava izvanrednu selektivnost i osjetljivost te se može koristiti i u detekciji elektroaktivnih komponenti u tragovima. U skladu s time, mogu se detektirati i polifenoli u tragovima u različitim biološkim uzorcima (Bayram i sur., 2012). HPLC-UV metoda uvedena je kao standardna metoda za kvantifikaciju biofenola u maslinovom ulju prema IOOC.

GC (plinska kromatografija, engl. *Gas Chromatography*) je oblik kromatografije gdje se sastavnice uzorka odjeljuju na principu različitog afiniteta analita za stacionarnu i mobilnu fazu, a mobilna je faza plin te korištenje MS detektora.

Kapilarna elektroforeza (engl. *Capillary Electrophoresis*, CE) je metoda odjeljivanja sastavnica uzorka koja se temelji na njihovoj različitoj brzini kretanja koja je ovisna o njihovom naboju i ionskom radijusu u uskoj kapilari ispunjenoj mobilnom fazom.

NMR (nuklearna magnetska rezonancija, engl. *Nuclear Magnetic Resonance*) temelji se na principu da neke jezgre koje imaju stalni nuklearni moment apsorpcijom elektromagnetskog zračenja radiofrekvencije prelaze u viši energetska nivo, a apsorpcija i emisija energije vezane uz zakretanje spina daje signal u NMR spektru.

IR (infracrvena spektrofotometrija, engl. *Infrared spectroscopy*) – infracrveno zračenje uzrokuje promjenu vibracijske energije, a IR-apsorpcijska vrpca je posljedica promjene u raspodjeli naboja unutar molekule.

Tablica 1. Pregled sadržaja polifenolnih sastavnica u maslinovom ulju porijeklom iz različitih zemalja.

	<b>Porijeklo</b>	<b>Polifenoli (mg ekvivalenata/kg)</b>	<b>Broj uzoraka</b>	<b>Literaturni navod</b>
1.	9 različitih zemalja i 4 kontinenta	45-532	55	Bayram i sur., 2012
2.	Hrvatska	236-1017	4	Bilušić i sur., 2017
3.	Španjolska	104;3-302	9	Borges i sur., 2017
4.	Brazil	75,18-151	2	Borges i sur., 2017
5.	Izrael	44-157	21	Gutfinger i sur., 1981
6.	Izrael	321-574	3	Gutfinger i sur., 1981
7.	Alžir	202-300	3	Yakhlef i sur., 2018
8.	Alžir	150-395	3	Yakhlef i sur., 2018
9.	Argentina	39-657	6	Ceci i sur., 2017
10.	Tunis	101-815	21	Mohamed i sur., 2018
11.	Italija	358-659	5	Mohamed i sur., 2018
12.	Čile	69-186	46	Fuentes i sur., 2012

### 1.3. ANTIOKSIDANSI

Antioksidansi su molekule koje sprječavaju oksidaciju supstrata. To znači da mogu ukloniti slobodne radikale i zaštititi stanicu od štetnih djelovanja reaktivnih slobodnih radikala, a posljedično prevenirati i razne bolesti.

Enzimski antioksidansi su: superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT), glutation peroksidaza (GPx) i glutation reduktaza (GRx), dok u ne-enzimske antioksidanse svrstavamo različite endogene i egzogene tvari. Endogene tvari organizam sam proizvodi poput: lipidna kiselina, glutation, L-arginin, koenzim Q10, melatonin, urična kiselina, bilirubin, kelati metala, transferin itd. Egzogene supstance organizam ne proizvodi te ih je potrebno unositi hranom i suplementima (npr. vitamin E, vitamin C, karotenoidi, metali u tragovima, flavonoidi, omega-3 i omega-6 masne kiseline i drugi).

Antioksidansi uneseni hranom i suplementima imaju važnu ulogu u pomaganju endogenim antioksidansima u neutralizaciji oksidativnog stresa. Njihova deficijencija može pridonijeti razvoju brojnih kroničnih i degenerativnih bolesti (Pham-Huy i sur., 2008).

Oksidacija, a time i degradacija lipida odvija se u prisutnosti kisika i može se opisati u 3 koraka. Prvi se korak odnosi na nastajanje peroksida (inicijacija), drugi na stvaranje intermedijarnih peroksida i slobodnih radikala (propagacija), a treći na prekid lančanih reakcija nastankom stabilnih produkata oksidacije (terminacija). Taj proces mogu potaknuti različiti čimbenici kao što su svjetlost, toplina i slobodni radikali. Osim što ovaj proces smanjuje kvalitetu osjetilnih svojstava hrane, ima i nepovoljan utjecaj na zdravlje.

Kako bi se lipidna oksidacija i užeglost kao posljedica oksidacijskih procesa izbjegli ili usporili u prehrambene proizvode se dodaju razni antioksidansi. Oni ometaju proces oksidacije formirajući stabilni radikal u reakciji sa slobodnim lipidnim radikalom. Takav stabilni radikal je manje reaktivan i ne reagira brzo s kisikom. Razlikujemo primarne i sekundarne antioksidanse. Primarni antioksidansi prekidaju lančane oksidacijske reakcije tako što djeluju kao donatori elektrona lipidnim radikalima i na taj način nastaju spojevi koju su otporniji na proces oksidacije. Sekundarni antioksidansi djeluju kao kelatori vezujući metale. Budući da mogu potaknuti djelovanje primarnih antioksidansa, nazivaju se još i sinergistički antioksidansi.

Sintetski antioksidansi odlikuju se visokom stabilnošću i efikasnosti. Primjerice butil-hidroksitoluen i butil-hidroksianisol su često korišteni konzervansi, posebice u industriji masnih i mesnih proizvoda. Unatoč izvrsnim antioksidativnim svojstvima, postoji opravdana

zabrinutost u pogledu sigurnost sintetskih spojeva u hrani. Tako prirodni spojevi povoljnije utječu na zdravlje, a takav trend prati i prehrambena industrija.

U prirodne antioksidanse ubrajamo polifenole, askorbate i tokoferole. Polifenoli kao primarni antioksidansi djeluju kao donatori elektrona i na taj način utišavaju radikale. Sekundarni antioksidansi poput askorbinske kiseline odnosno vitamin C regenerira stabilne antioksidativne radikle ili kelatira metale i na taj način se suprotstavlja peroksidaciji lipida i pigmenata, a djelovanje ovisi o koncentraciji, metalnim ionima i drugim antioksidativnim spojevima. Tokoferoli imaju značajke i primarnih i sinergističkih antioksidansa. Donatori su hidrida, no kroz regeneraciju askorbinske kiseline pokazuju i sinergistički efekt. Ovisno o strukturi, odnosno broju i orijentaciji hidroksilnih skupina razlikujemo  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  i  $\delta$ -tokoferol od kojih je  $\alpha$ -tokoferol najznačajniji.

Danas se polifenoli obnavljaju iz otpadnih voda nastalih tijekom obrade maslina. Na taj način dobivaju se prirodni antioksidansi i koriste kao prirodni konzervansi i bioaktivni aditivi u prehrambenim i kozmetičkim proizvodima.

Uz brojna istraživanja koja potvrđuju pozitivna biološka djelovanja polifenola među kojima je antioksidativno djelovanje najistaknutije, postoji nedostatak poredbenih istraživanja koja uspoređuju njihovu učinkovitost s drugim antioksidansima te onih istraživanja koja proučavaju izravnu primjenu polifenola u prehrambenim proizvodima (Galanakis i sur., 2018).

Tradicionalni testovi za mjerenje antioksidativne aktivnosti su DPPH, ABTS i FRAP. DPPH i ABTS testovi mjere kapacitet uklanjanja radikala, dok FRAP mjeri moć redukcije  $\text{Fe}^{3+}$  iona. Iako navedeni testovi daju u analitičkom pogledu ispravne rezultate, analiziranjem uzorka nakon ekstrakcije organskim otapalom mogu se dobiti rezultati koji ne opisuju događaje nakon unosa u organizam. Za predodžbu *in vivo* učinaka pojedinih antioksidansa treba uzeti u obzir i fiziološke čimbenike. Razlog tome je što hranjive tvari prolaze proces razgradnje u gastrointestinalnom sustavu nakon konzumiranja. Biološki aktivne tvari trebaju se osloboditi iz složenog matriksa hrane i apsorbirati iz gastrointestinalnog sustava kako bi mogle ispoljiti svoj učinak. Rješenje leži u postizanje uvjeta probave poput: pH, enzima i njihove koncentracije, vrijeme razgradnje i drugih čimbenika. Iako postoje brojni dokazi koji govore u prilog antioksidativnom i kemoprotektivnom djelovanju pojedinačnih sastavnica maslinovog ulja, nedostaju podaci o ukupnom učinku svih biološki aktivnih komponenti maslinovog ulja nakon probavnog procesa. U dostupnoj literaturi utjecaj digestije na učinak bioaktivnih komponenti ove vežne namirnice odlučujući je čimbenik kojeg svakako treba uzeti u obzir (Borges i sur., 2017).

## **2. OBRAZLOŽENJE TEME**

Ekstra djevičansko maslinovo ulje dobar je izvor prirodnih antioksidansa poput tokoferola, karotenoida, sterola i polifenolnih sastavnica. Ove biološki aktivne tvari, a posebice polifenoli, imaju izraženu aktivnost u hvatanju slobodnih radikala te im se pripisuje ključna uloga u preventivnom i terapijskom djelovanju maslinovog ulja na ljudsko zdravlje. Cilj ovog rada bio je:

- (i) procijeniti kvalitetu ispitivanih maslinovih ulja obzirom na sadržaj ukupnih polifenola,
- (ii) odrediti antioksidativnu aktivnost istih,
- (iii) korelirati sadržaj ukupnih polifenolnih sastavnica maslinovih ulja i njihovu antioksidativnu aktivnost i utvrditi njihovu moguću povezanost te
- (iv) usporediti sadržaj ukupnih polifenola i antioksidativnu aktivnost prikupljenih maslinovih ulja s dostupnim podacima za druga maslinova ulja.

### **3. MATERIJALI I METODE**



### **3.1. MATERIJALI**

#### **3.1.1. Kemikalije**

- Folin-Ciocalteu reagens (Merck, Njemačka)
- Galna kiselina, certificirani referentni materijal, TraceCERT® (Fluka Analytical, Švicarska)
- Metanol, čistoće za tekućinsku kromatografiju (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- Natrijev karbonat (Sigma Aldrich, SAD)
- n-heksan, ACS-reag. Ph. Eur. (CARLO ERBA, Italija)
- 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil, DPPH, slobodni radikal, 95 % (Sigma-Aldrich, Njemačka)
- 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina, Trolox (Sigma-Aldrich, Švicarska)

#### **3.1.2. Uzorci**

- 30 uzoraka maslinovog ulja sakupljeni su iz različitih dijelova Republike Hrvatske

#### **3.1.3. Radni instrumenti**

- Sustav za pročišćavanje vode (Milipore, Bedford, MA, SAD)
- UV-VIS spektrofotometar Agilent 8453 E (Hewlett Packard, Njemačka)

#### **3.1.4. Pribor**

- Automatske jednokratne pipete podesivog volumena za pipetiranje uzoraka (Rainin, Švicarska)
- Centrifuga, Nanofuge (Hoefer Scientific Instruments, SAD)
- Grijalica/mješalica Ika C-MAG HS 7 (Ika-Werke GMBH&CO.KG, Njemačka)
- Kvarcna kiveta za UV-VIS spektrofotometar volumena 3.5 mL i duljine optičkog puta 10 mm (PerkinElmer, Waltham, SAD)
- Analitička vaga (Mettler Toledo, Švicarska)
- Tresilica Lab Dencer – vortex (Ika-Werke GMBH&CO.KG, Njemačka)

#### **3.1.4. Programski paketi**

- Microsoft Office Excel (Microsoft, Seattle, WA, SAD)
- Statistica 12.1 (StatSoft, Inc., SAD)
- ChemSketch (ACD Inc., SAD)

## 3.2. METODE

Određivanje ukupnih polifenola u maslinovom ulju provedeno je primjenom UV- VIS spektrofotometrije i Folin-Ciocalteu reagensa. Ove biološki aktivne tvari, analiti, iz uzorka su ekstrahirani primjenom ekstrakcije tekuće-tekuće. Nakon optimizacije postupka ekstrakcije i određivanja sadržaja ukupnih polifenola, ispitana je antioksidativna aktivnost maslinovog ulja DPPH metodom.

### 3.2.1 Priprema standardnih otopina

Standarda otopina galne kiseline pripremljena je otapanjem odgovarajuće mase spoja u 60%-tnom metanolu (60:40, vol/vol), (koncentracija 2 mg/mL).

Nakon toga prikladnim razrjeđivanjem pripremljen je niz radnih otopine za izradu kalibracijske krivulje galne kiseline, a koncentracije su iznosile: 0,4, 0,8 2,0, 4,0 i 8,0 µg/mL. Folin-Ciocalteu reagens pripremljen je razrjeđivanjem s ultračistom vodom u omjeru 1:10 neposredno prije uporabe.

Natrijev karbonat pripremljen je kao 10%-tna otopina u ultračistoj vodi.

Radne otopine za izradu kalibracijske krivulje Trolox-a pripremljene su otapanjem odgovarajuće mase krute tvari u 75%-tnom metanolu (75:25, vol/vol) (koncentracija 10 mmol/L). Koncentracije radnih otopina Trolox-a iznosile su redom 0,10, 0,15, 0,20, 0,25, 0,30, 0,35, 0,50, 0,80 i 1,00 mmol/L.

DPPH otopina pripremljena je otapanjem odgovarajuća masa krute tvari u metanolu korištenjem tamne odmjerne tikvice klase A ( $c=0,1$  mmol/L).

### 3.2.2. Ekstrakcija polifenola metodom tekuće- tekuće

U Falcon™ epruvetu odvaži se 2,5 g maslinovog ulja doda 5 mL *n*-heksana te dobro promućka. Nakon toga, u epruvetu se otpipetira 3 ml 60%-tnog metanola (60:40, vol/vol) te smjesa stavi na tresilicu 2 minute. Zatim se uzorci centrifugiraju u trajanju od 10 min pri 3500 rpm. Nakon odvajanja faza postupak se ponovi još jednom s heksanskom fazom, dodavanjem 3 mL 60%-tnog metanola (60:40, vol/vol). Na kraju se spoje obje metanolne faze u kojima su ekstrahirane polifenolne sastavnice.

### 3.2.3. Spektrofotometrijska metoda za određivanje ukupnih polifenola

Koncentracija ukupnih polifenola u maslinovom ulju određen je Folin–Ciocalteuovom kolorimerijskom metodom. Ukratko, u odmjernu tikvicu klase A (5 mL) otpipetira se 0,20 mL prethodno pripremljenog metanolnog ekstrakta te razrijedi ultračistom vodom do 2,5 mL. Zatim se u istu odmjernu tikvicu otpipetira 0,25 mL Folin-Ciocalteu reagensa, malo promućka a nakon 3 min doda 0,5 mL 10%-tne otopine natrijeva karbonata. Tako dobivena smjesa se dobro promućka i nadopuni ultračistom vodom do oznake te ostavi na tamno mjesto. Nakon inkubacije od 2 sata pri sobnoj temperaturi, apsorbancija uzorka mjeri se pri valnoj duljini 725 nm. Slijepa proba se izradi prema propisu, pri čemu se umjesto 0,20 mL metanolnog ekstrakta otpipetira isti volumen 60%-tnog metanola (60:40, vol/vol).

Količina ukupnih polifenola odredi se korištenjem kalibracijske krivulje standarda, a sadržaj ukupnih polifenola izrazi se kao mg galne kiseline po kg uzorka. Određivanje je provedeno u triplicatu.

### 3.2.4. Određivanje antioksidativne aktivnosti DPPH metodom

Sposobnost maslinovog ulja u “hvatanju” stabilnog slobodnog radikala 2,2–difetil–1–pikrilhidrazil (DPPH) procijenjena je metodom Zullo i Ciafardini (2008), s malim modifikacijama. Ukratko, u Falcon™ epruvetu otpipetira se 200 µL ispitivanog uzorak maslinovog ulja i 600 µL metanola te dobro promućka i centrifugira 3 min. Zatim se u novu Falcon™ epruvetu otpipetira 100 µL metanolnog ekstrakta, doda prethodno pripremljena metanolna otopina DPPH (4 mL 0,1 mM). Smjesa se promiješa 15 s i ostavi na tamnom mjestu pri sobnoj temperaturi. Nakon 30 minuta, apsorbancija otopine očitana je spektrofotometrijski pri  $\lambda_{\max} = 517$  nm uz metanol kao slijepu probu.

Sposobnost „hvatanja“ slobodnog radikala izračunata je kao postotak obezbojenja otopine slobodnog radikala (SR) korištenjem formule 1.

$$\% \text{ inhibicije SR} = \left(1 - \frac{A_{UZ}}{A_0}\right) \cdot 100 \quad (1)$$

gdje je  $A_{UZ}$  apsorbancija otopine uzoraka maslinovog ulja nakon dodatka otopine slobodnog radikala, dok je  $A_0$  apsorbancija otopine slobodnog radikala. Svaki uzorak je analiziran u triplicatu.

Antioksidativna aktivnost određena je iz kalibracijske krivulje standarda Trolox-a, a rezultati izraženi kao mmol ekvivalenta Trolox-a / L, odnosno mmol ekvivalenta Trolox-a / kg ulja.

### 3.2.5. Statistička obrada podataka

Dobiveni eksperimentalni podaci analizirani su primjenom deskriptivne statistike. U obradi dobivenih podataka za sve je varijable provedena analiza normalnosti raspodjele Kolmogorov-Smironovim testom. Varijable s normalnom raspodjelom prikazane su aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom, dok su ostale varijable prikazane medijanom i interkvartilnim rasponom, odnosno gornjom granicom prve i treće kvartile (25. i 75. percentila).

Pearsonov koeficijent korelacije i Spearmanov koeficijent korelacije rangova korišteni su kako bi se ispitala razina povezanosti između pojedinih varijabli.

P-vrijednost manja od 0.05 smatrana je statistički značajnom, dok je p-vrijednost manja od 0.01 uzeta kao statistički visoko značajna za sve korištene analize.

Pomoću regresijske analize dobivene su jednadžbe pravca i pripadajući koeficijenti determinacije  $r^2$ .

Za obradu svih eksperimentalnih podataka korišteni su računalni programi Microsoft® Office Excel 2010 (Microsoft Corporation, SAD) i Statistica 12.1 (StatSoft, Inc., SAD).

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

#### 4.1. SADRŽAJA UKUPNIH POLIFENOLA U MASLINOVOM ULJU

Za ekstrakciju polifenolnih tvari iz uzoraka ulja korišten je modificirani postupak prema Fuentes i sur. (2012), a za njihovo određivanje postupak prema Gutfinger-u (Gutfinger, 1981) uz Folin-Ciocalteu reagens (Singleton, 1965).

Iako kemijska struktura Folin-Ciocalteu reagensa još uvijek nije u potpunosti razjašnjena, poznato je da dio strukture čine fosfomolibdenske i fosfovolframske heteropoli kiseline, koje su žute boje. Smatra se da u prisustvu fenola u bazičnom reakcijskom mediju nastaje kompleks Mo-W, koji reakcijsku smjesu oboji u plavo. Odnosno, navedeni reagens s reducirajućim fenolnim spojevima stvara kromogene spojeve čiji se intenzitet obojenja mjeri spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 725 nm.

Sadržaj ukupnih polifenola u maslinovim uljima određen je na temelju vrijednosti apsorbancija uzoraka upotrebom kalibracijske krivulje standarda galne kiseline, te su vrijednosti izražene kao mg galne kiseline po kg uzorka. Za izradu kalibracijske krivulje korištene su sljedeće otopine: galna kiselina (2 mg/mL) u 60%-tnom metanolu, 10%-tna vodena otopina natrijevog karbonata i Folin-Ciocalteu reagens (razrijeđen s ultračistom vodom u omjeru 1:10). Otopine galne kiseline rastućih koncentracija (od 0,4 do 8 µg/mL) priređene su za izradu kalibracijske krivulje (Slika 1).

O ovom radu sakupljeno je 30 uzoraka maslinovog ulja iz različitih područja Republike Hrvatske. Sakupljena ulja podrijetlom su s područja istarskog poluotoka, ali i Dalmacije. U pogledu strukture sorta sakupljena su ulja dobivena od autohtonih sorti poput oblice, istarske bjelice i drobnice, ali i introduciranih sorti poput leccino, pendolino i drugih.

U istraživanje su uključena maslinova ulja maslinara koji posjeduju maslinike male veličine, te ulja proizvode isključivo za vlastite potrebe, zatim maslinova ulja proizvođača koji imaju obrt registriran za obavljanje poljoprivredne aktivnosti, ali i ulja većih distributera.

Rezultati dobiveni navedenom spektrofotometrijskom metodom prikazuju relativno veliku varijabilnost u sadržaju polifenola analiziranih maslinovih ulja (11,36-313,15 mg polifenola/kg maslinovog ulja), dok je srednja vrijednost ukupnih polifenola iznosila 123,64 mg polifenola/kg ulja (Tablica 3). Sva mjerenja provedena su u triplicatu, a RSD vrijednosti bile su manje od 10,7%.

Ovako velike razlike ukupnog sadržaja polifenola u analiziranim uzorcima rezultat su različitih proizvodnih procesa. Tako je ekstra djevičansko maslinovo ulje dobiveno hladnim tiještenjem zdravog ploda masline imalo veće količine ovih biološki aktivnih sastavnica, dok

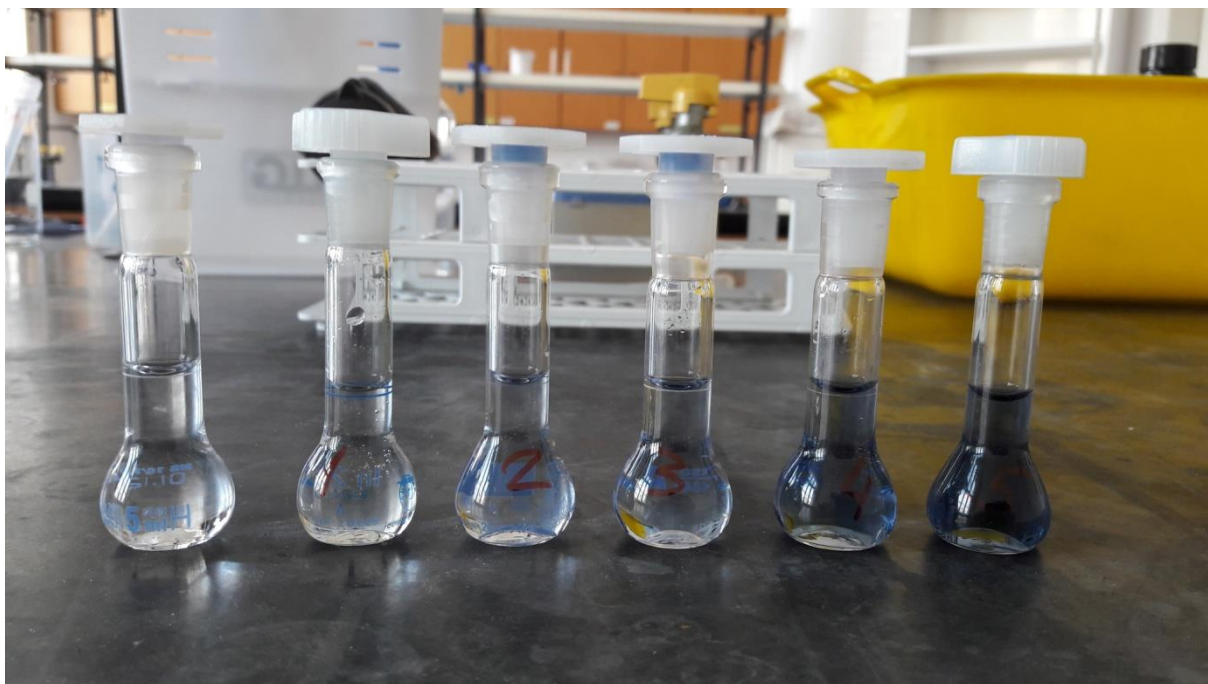
su maslinova ulja dobivena miješanjem rafiniranog ulja i određene količine ekstra djevičanskog ulja sadržavala manje količine polifenola.

Treba istaknuti da su dostupni literaturi podaci o sadržaja polifenola u maslinovim uljima izraženi na različite načine i pri tome korišteni različiti standardi poput galne kiseline (Bayram i sur., 2012, Žanetić i sur., 2014, Pellegrini i sur., 2001), kavene kiseline (Borges i sur., 2017). Tako su Bayram i sur. (2012) analizirali 55 uzoraka ekstra djevičanskog maslinovog ulja porijeklom iz Italije (10), Španjolske (12), Turske (12), Grčke (7), Francuske (3), Portugala (4), Australije (3), SAD (3) i Južne Afrike (1). Rezultati dobiveni u ovom radu u skladu su sa sadržajem polifenola u prethodno navedenim uzorcima (45–532 mg galne kiseline/kg ulja). Također se može primijetiti da je sadržaj ovih biološki aktivnih sastavnica maslinovih ulja iz različitih zemalja oscilirao u širem intervalu, pri čemu su ulja iz Italije imala najveći sadržaj polifenola.

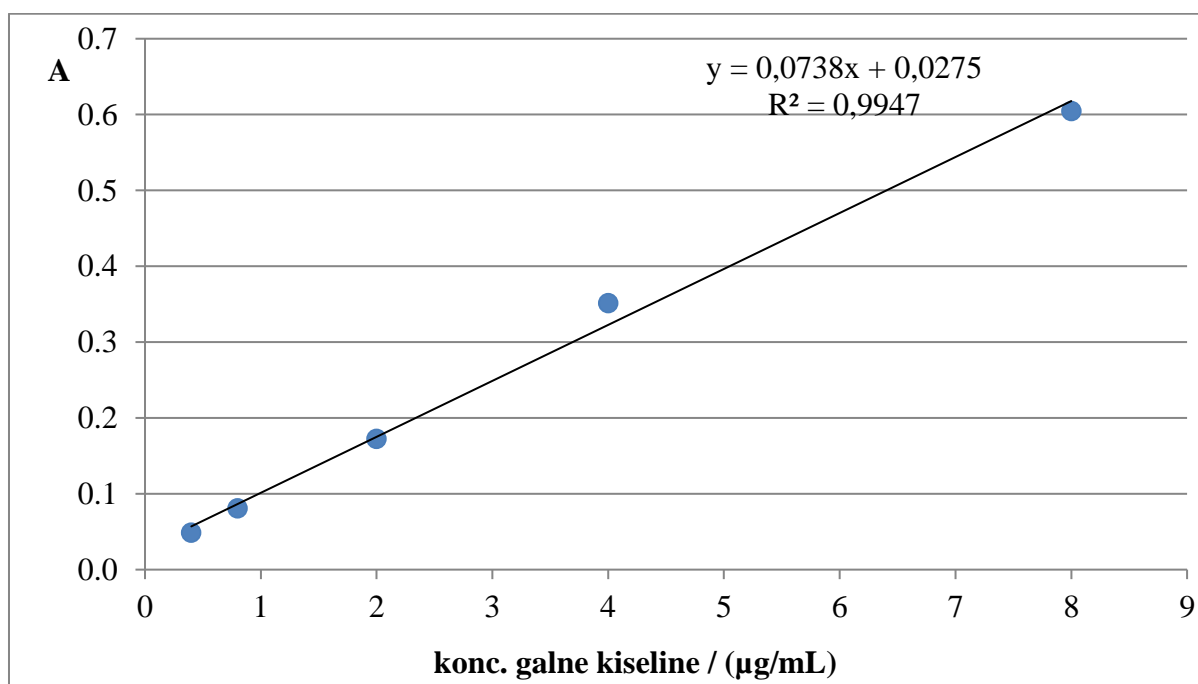
Osim toga, dobiveni rezultati su u skladu s literaturnim podacima za talijanska ekstra djevičanska maslinova ulja (Pellegrini i sur., 2001). Pellegrini i sur. analizirali su 6 uzoraka ekstra djevičanskog maslinovog ulja (73–265 mg galne kiseline/kg ulja), 3 maslinova ulja (14–30 mg galne kiseline/kg ulja) prikupljena na tržištu Italije te rafinirano maslinovo ulje (4 mg galne kiseline/kg ulja). Rezultati navedenog istraživanja pokazali su da sadržaj ukupnih polifenola ovisi o proizvodnom procesu dobivanja ulja.

Sadržaj polifenola u maslinovom ulju oscilira ovisno o nizu faktora, poput godini. Tako su Žanetić i sur. (2014) analizirali sadržaj polifenola u maslinovim uljima iz Dalmacije u dvije uzastopne godine. Sadržaj ukupnih polifenola bio je u rasponu od 85,59 mg galne kiseline/kg ulja u prvoj godini do 382,99 mg galne kiseline/kg ulja u drugoj godini.

Gore navedeni rezultati upućuju na to da se radi o izuzetno kvalitetnim maslinovim uljima s područja Republike Hrvatske. Također, potrebno je istaknuti da je nešto veći udio polifenolnih spojeva prisutan u maslinovim uljima proizvođača koji imaju obrt registriran za obavljanje poljoprivredne aktivnosti.



Slika 1. Radne otopine za izradu kalibracijske krivulje galne kiseline.



Slika 2. Kalibracijska krivulja standarda galne kiseline dobivena spektrofotometrijskom metodom za određivanje sadržaja ukupnih polifenola.



## 4.2. PROCJENA ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI MASLINOVOG ULJA

U dostupnoj znanstvenoj i stručnoj literaturi mogu se naći brojni primjeri metoda za mjerenje antioksidativne aktivnosti hrane i pića. Ove metode se razlikuju u stvaranju različitih radikala i / ili ciljnih molekula te načinu mjerenja završne točke. Sve razvijene metode imaju svoje prednosti, ali i nedostatke u procjeni antioksidativne aktivnosti. Zbog svojih prednosti poput brza, jednostavna i jeftinija metoda, DPPH metoda široko je korištena za ispitivanje sposobnosti sastavnica hrane u neutralizaciji slobodnih radikala.

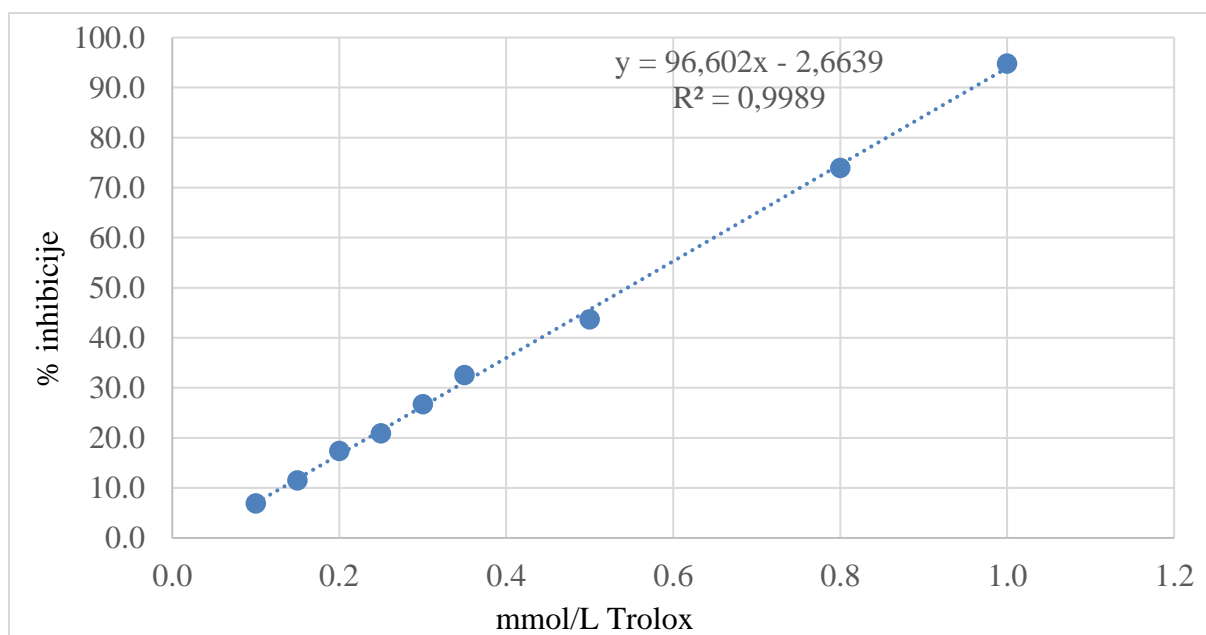
Za određivanje antioksidativne aktivnosti različitih uzoraka maslinovog ulja DPPH metodom korišten je modificirani postupak prema Fiorini i sur. (2018), a za njihovo određivanje postupak prema Zullo i Ciafardini (2008).

Ukratko, primjenjivani test temelji se na redukciji stabilnog slobodnog radikala 2,2–difetil–1–pikrilhidrazila (DPPH) otopljenog u alkoholnoj otopini u prisustvu antioksidansa koji donira jedan atom vodika i „hvata“ slobodni DPPH radikal pri čemu nastaje neradikalni, hidrazin, oblik DPPH-H i stabilni fenoksi radikal (A). Smanjenje vrijednosti apsorbancija uzorka na valnoj duljini od 517 nm proporcionalno je količini antioksidansa prisutnih u analiziranom ulju.

Ukupna antioksidativna aktivnost maslinovog ulja određena je na temelju vrijednosti apsorbancija uzoraka koristeći kalibracijsku krivulju standarda Trolox-a, te su vrijednosti prikazane kao koncentracije Trolox-a izražene u mmol/L. Za izradu kalibracijske krivulje korištene su radne otopine Trolox-a rastućih koncentracija (od 0,1 do 1,0 mmol/L) (Tablica 2). Na Slici 3. prikazana je dobivena kalibracijska krivulja, te vrijednost koeficijenta korelacije ( $R^2=0,9989$ ), koja upućuje na zadovoljavajuću linearnost metode.

Tablica 2. Radno područje i kalibracijska krivulja primijenjenih UV-VIS metoda za određivanje koncentracije ukupnih polifenola te procjenu antioksidativne aktivnosti maslinovih ulja DPPH metodom.

	$\lambda_{\text{kvant}}$ (nm)	Radno područje	Kalibracijska krivulja	Broj radnih otopina standarda	Koeficijent korelacije
Ukupni polifenoli ( $\mu\text{g}$ galne kiseline/mL)	725	0,4 – 8	$y = 0,0738x + 0,0275$	5	0,9947
DPPH test (mmol/L Trolox)	517	0,1 – 1	$y = 96,602x - 2,6639$	9	0,9989



Slika 3. Kalibracijska krivulja standarda Trolox-a dobivena spektrofotometrijskom metodom za određivanje antioksidativne aktivnosti (DPPH metoda). % inhibicije SR izračunat je prema formuli 1. SR- slobodni radikal.

U istraživanje je uključeno svih 30 uzoraka maslinovog ulja kojima je prethodno određen sadržaj ukupnih polifenola, što je opisano u poglavlju 4.1.

Dobiveni rezultati ukazuju na varijabilnost antioksidativne aktivnosti pojedinih uzoraka maslinovih ulja ovisno o ukupnom sadržaju polifenola. Koncentracije dobivene primjenom DPPH metode kreću se u rasponu od 0,09 mmol/L do 1,44 mmol/L Trolox-a (Tablica 3), pri čemu su sva mjerenja provedena u triplicatu, te su RSD vrijednosti bile do 5,0%.

Usporedbu rezultata ovog rada s onim dobivenim od strane drugih autora korištenjem DPPH metode dosta je teško izvršiti zbog razlika u pripremi uzoraka za analizu i načinu izražavanja rezultata. Tako su pri izražavanju rezultata antioksidativne aktivnosti neki autori koristili mmol Trolox/L, odnosno mmol Trolox/kg ulja, dok su drugi (Loizzo i sur., 2012) svoje rezultate prikazali u obliku IC<sub>50%</sub> ili EC<sub>50%</sub> vrijednosti, koja se može definirati kao koncentracija maslinovog ulja potrebna za 50% smanjene početne vrijednosti DPPH slobodnog radikala.

Borges i sur. (2017) analizirali su 33 uzorka ekstra djevičanskog maslinovog ulja iz 11 različitih geografskih područja (n=3 iz svake oblasti) Španjolske (9 oblasti) i Brazila (2 oblasti). Srednje vrijednosti antioksidativne aktivnosti navedenog istraživanja (0,56 do 0,97 mmol Trolox/kg ulja iz Brazila; 0,52 do 1,58 mmol Trolox/kg ulja iz Španjolske) bile su u skladu s vrijednosti dobivene u ovom istraživanju. Nadalje, Samaniego Sanchez i sur. (2007)

proveli su istraživanje na 39 uzoraka ekstra djevičanskog maslinovog ulja, odnosno 13 uzoraka iz 3 godine, dok je 6 maslinovih ulja korišteno za usporedbu. Antioksidativna aktivnost bila je u uskom intervalu od 204 do 587  $\mu\text{mol Trolox/L}$ . Osim toga, u dostupnoj literaturi mogu se naći primjeri procijenjene antioksidativne aktivnosti hrvatskih maslinovih ulja. Antioksidativna aktivnost maslinovih ulja iz Dalmacije u dvije uzastopne godine kretala se u rasponu od 0,79 do 1,46  $\text{mmol Trolox /kg ulja}$  (Žanetić i sur., 2014).

Tablica 3. Sadržaj ukupnih polifenola i antioksidativna aktivnost u analiziranim maslinovim uljima (n=30) određen prema prethodno opisanim spektrofotometrijskim metodama.

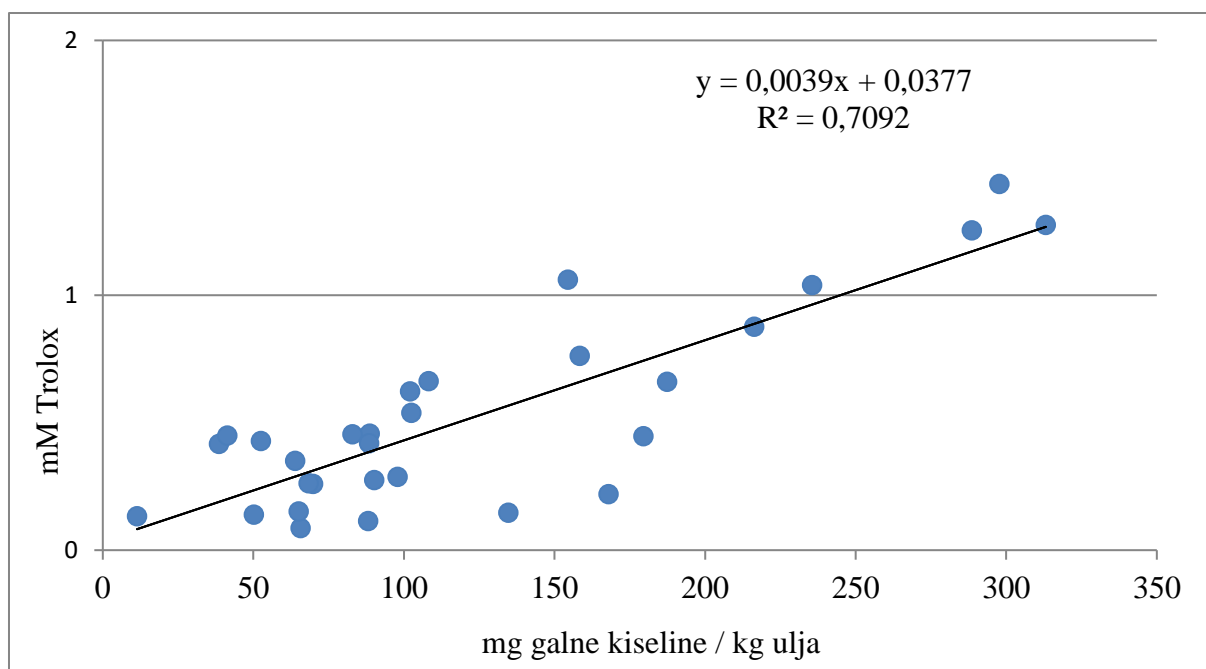
Parametar	SV	Medijan	Raspon kvantificiranih vrijednosti	Interkvartil
Ukupni polifenoli (mg galne kiseline / kg ulja)	123,64	94,01	11,36-313,15	66,36-165,51
Antioksidativna aktivnost (mM Trolox)	0,52	0,44	0,09-1,44	0,26-0,66
Antioksidativna aktivnost (mM Trolox / kg ulja)	0,58	0,49	0,10-1,59	0,27-0,72

Legenda: SV – srednja vrijednost tri ponovljena mjerenja

Zanimljivo je naglasiti da su rezultati provedene statističke analize pokazali statistički značajnu korelaciju (Spearmanov koeficijent  $r=0.6952$  i  $p<0.01$ ; Pearsonov koeficijent korelacije  $r=0.8421$ ;  $p<0.01$ ) između sadržaja ukupnih polifenola i antioksidativne aktivnosti u analiziranim maslinovim uljima.

U grčkim maslinovim uljima (n=50 uzoraka) korelacija između ukupnih polifenola i antioksidativne aktivnosti procijenjene DPPH metodom iznosila je od 0,39 do 0,98 ovisno o vrsti ulja (Minioti i Georgiou, 2010). U dostupnoj literaturi nalaze se podaci povezanosti sadržaja polifenola i antioksidativne aktivnosti kroz niz godina (Samaniego Sanchez i sur., 2007). Tako je na uzorcima (n=39) prikupljenim kroz 3 godine (svaka godina 13 uzoraka) utvrđena prosječna korelacija  $R^2=0,8052$ . Kada se rezultati ovog istraživanja prikazani na Slici 4 ( $R^2=0,7092$ ) usporede s vrijednostima u tri godine navedenog istraživanja, najveća usklađenost je u trećoj godini ( $R^2=0,7387$ ).

Na temelju rezultata ovog istraživanja, znatna količina polifenola nalazi se u hrvatskim maslinovim uljima, dok je antioksidativna aktivnost ove važne namirnice u skladu s koncentracijama ovih bioaktivnih fitokemikalija.



Slika 4. Korelacija između sadržaja ukupnih polifenola i antioksidativne aktivnosti (DPPH metoda) analiziranih maslinovih ulja izražena u (a) mM Trolox-a, odnosno.

## **5. ZAKLJUČAK**

Ciljevi ovog rada obrazloženi su u poglavlju 2. Na temelju provedenog istraživanja, dobivenih rezultata i rasprave moguće je zaključiti sljedeće:

- (i) Analizirana maslinova ulja mogu se smatrati dobrim izvorom polifenolnih sastavnica te upućuju na iznimnu kvalitetu ovih ulja s područja Republike Hrvatske.
- (ii) Antioksidativna aktivnost ispitivanih maslinovih ulja proporcionalna je izmjerenom sadržaju ovih biološki aktivnih sastavnica.
- (iii) Rezultati ovog istraživanja u skladu su s dostupnim literaturnim podacima za različita maslinova ulja iz drugih zemalja.
- (iv) Obje korištene metode su brze i iznimno ponovljive te prikladne za rutinske analize maslinovog ulja.
- (v) Potrebna su daljnja istraživanja antioksidativne aktivnosti i pojedinih sastavnica polifenola primjenom drugih metoda.
- (vi) Također je u istraživanje potrebno uključiti i maslinova ulja dobivena od drugih sorti maslina kroz niz godina.

## **6. LITERATURA**

- Alowaiesh B, Singh Z, Fang Z, Kailis SG. Harvest time impacts the fatty acid compositions, phenolic compounds and sensory attributes of Frantoio and Manzanilla olive oil. *Scientia Horticulturae*, 2018, 234, 74-80.
- Bayram B, Esatbeyoglu T, Schulze N, Ozcelik B, Frank J, Rimbach G. Comprehensive Analysis of Polyphenols in 55 Extra Virgin Olive Oils by HPLC-ECD and Their Correlation with Antioxidant Activities. *Plant Foods Hum Nutr*, 2012, 67, 326-336.
- Borges TH, Lopez LC, Pereira JA, Cabrera-Vique C, Seiquer I. Comparative analysis of minor bioactive constituents (CoQ10, tocopherols and phenolic compounds) in Arbequina extra virgin olive oils from Brazil and Spain. *J Food Compost Anal*, 2017, 47-54.
- Borges TH, Pereira JA, Cabrera-Vique C, Seiquer I. Study of the antioxidant potential of Argentina extra virgin olive oils from Brazil and Spain applying combined models of simulated digestion and cell culture markers. *J Funct Foods*, 2017, 209-218.
- Fiorini D, Boarelli MC, Conti P, Alfei B, Caprioli G, Ricciutelli M, Sagratini G, Fedeli D, Gabbrianelli R, Pacetti D. Chemical and sensory differences between high price and low price extra virgin olive oils. *Food Res Int*, 2018, 65-75.
- Galanakis CM, Tsatalas P, Charalambous Z, Galanakis IM. Polyphenols recovered from olive mill wastewater as natural preservatives in extra virgin olive oils and refined olive kernel oils. *Environmental technology and innovation*, 2018.
- Gutfinger T. Polyphenols in olive oils. *J Am Oil Chem Soc*, 1981, 966-968.
- Gorzynik-Debicka M, Przychodzen P, Cappello F, Kuban-Jankowska A, Gammazza AM, Knap N, Wozniak M, Gorska-Ponikowska M. Potential Health Benefits of Olive oil and Plant Polyphenols. *Int. J. Mol. Sci*, 2018, 19, 1-13.
- Loizzo MR, Di Lecce G, Boselli E, Menichini F, Frega NG. Radical Scavenging, Total Antioxidant Capacity, and Antiproliferative Activity of Phenolic Extracts from Extra Virgin Olive Oil by Cultivar 'Frantoio'. *Int J Food Prop*, 2012, 15, 1345-1357.
- Maslinovo ulje u službi zdravlja, 2008., <https://www.vitamini.hr>, pristupljeno 10. 6. 2018.
- Minioti KS, Georgiou CA. Comparison of different test used in mapping the Greek virgin olive oils production for the determination of its total antioxidant capacity. *Grasas Y Aceites*, 2010, 61, 45-51.
- Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *Int J Biomed Sci*, 2008, 4, 89-96.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice Evans C. Antioxidant Activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Radic Biol Med*, 1999, 1231-1237.



- Rigacci S, Stefani M. Nutraceutical Properties of Olive Oil Polyphenols. An Itinerary from Cultured Cells through Animal Models to Humans. *International Journal of Molecular Science*, 2016.
- Samaniego Sánchez C, Troncoso González AM, García-Parrilla MC, Quesada Granados JJ, López García de la Serrana H, López Martínez MC. Different radical scavenging tests in virgin olive oil and their relation to the total phenol content. *Anal Chim Acta*, 2007, 12, 103-107.
- Servili M, Montedoro GF. Contribution of phenolic compounds to virgin olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2002, 14, 9-10.
- Shahidi F, Ambigaipalan P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects- A review. *J Funct Foods*, 2015, 18, 820-897.
- Shahidi F, Zhong Y. Measurement of antioxidant activity. *J Funct Foods*, 2015, 757-781.
- Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *AM J Enol Viticult*, 1965, 13, 144-158.
- Zullo BA, Ciafardini G. The olive oil oxygen radical absorbance capacity (DPPH assay) as a quality indicator. *Eur J Lipid Sci Technol*, 2008, 110, 428-434.
- Žanetić M, Gugić M. Zdravstvene vrijednosti maslinovog ulja. *Pulmologia Croatica*, 2006, 12, 159-173.
- Žanetić M, Cerretani L, Del Carloc M, Jukić Špika M. Phenolic profile and antioxidant activity of virgin olive oil from cv. Drobica. 8th International Congress of Food Technologists, Biotechnologists and Nutritionists, Opatija, 2014. [https://www.researchgate.net/publication/316787538\\_Phenolic\\_profile\\_and\\_antioxidant\\_activity\\_of\\_virgin\\_olive\\_oil\\_from\\_cv\\_Drobica](https://www.researchgate.net/publication/316787538_Phenolic_profile_and_antioxidant_activity_of_virgin_olive_oil_from_cv_Drobica), pristupljeno 10. 07. 2018.

## **7. SAŽETAK/SUMMARY**

Mediteranska prehrana bogata maslinovim uljem koje je glavni izvor masti sinonim je zdravog načina prehrane. Optimalan omjer nezasićenih i zasićenih masnih kiselina te antioksidativna aktivnost polifenola, tokoferola, karotenoida i klorofila osiguravaju blagotvoran učinak maslinovog ulja na ljudsko zdravlje. Polifenoli kao i druge fitokemikalije pokazuju veću učinkovitost ako se unose u organizam putem prirodnih izvora. Maslinovo je ulje dobar izvor polifenolnih sastavnica, kojima se pripisuje važna uloga u preventivnom i terapijskom djelovanju ove namirnice. Iz navedenog razloga cilj ovog diplomskog rada bio je procijeniti kvalitetu hrvatskih maslinovih ulja obzirom na sadržaj polifenola te odrediti antioksidativnu aktivnost istih. Sadržaj ukupnih polifenola u analiziranim maslinovim uljima određen je spektrofotometrijskom metodom korištenjem Folin-Ciocalteu reagensa, dok je antioksidativna aktivnost procijenjena DPPH testom. Rezultati istraživanja upućuju na iznimnu kvalitetu hrvatskih maslinovih ulja te se analizirana maslinova ulja mogu smatrati dobrim izvorom polifenolnih sastavnica. Antioksidativna aktivnost ispitivanih maslinovih ulja proporcionalna je izmjerenom sadržaju ovih biološki aktivnih sastavnica.

The Mediterranean diet rich in olive oil, which is the main source of fat, is a synonym for a healthy diet. The optimal ratio of unsaturated and saturated fatty acids and the antioxidant activity of polyphenols, tocopherols, carotenoids and chlorophylls ensure the beneficial effect of olive oil on human health. Polyphenols as well as other phytochemicals show higher efficacy when taken into the organism through natural sources. Olive oil is a good source of polyphenolic components, which take an important role in the preventive and therapeutic function of this food. The aim of this diploma thesis is to evaluate the quality of Croatian olive oils regarding the proportion of polyphenol and to determine their antioxidant activity. The total content of polyphenols in the analyzed olive oils was determined by spectrophotometric method using Folin-Ciocalteu reagent, while the antioxidant activity was estimated by the DPPH test. The results of the research point to the exceptional quality of Croatian olive oils and that the analyzed olive oils can be considered as a good source of polyphenolic components while the antioxidant activity of the examined olive oils complies with the content of these biologically active constituents.

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Farmacija  
Zavod za analitiku i kontrolu lijekova  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

# ODREĐIVANJE UKUPNIH FENOLA I ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI U MALINOVOM ULJU

Petra Šarenić

## SAŽETAK

Mediterranska prehrana bogata maslinovim uljem koje je glavni izvor masti sinonim je zdravog načina prehrane. Optimalan omjer nezasićenih i zasićenih masnih kiselina te antioksidativna aktivnost polifenola, tokoferola, karotenoida i klorofila osiguravaju pozitivan učinak maslinovog ulja na ljudsko zdravlje. Polifenoli kao i druge fitokemikalije pokazuju veću učinkovitost ako se unose u organizam putem prirodnih izvora. Maslinovo je ulje dobar izvor polifenolnih sastavnica, kojima se pripisuje važna uloga u preventivnom i terapijskom djelovanju ove namirnice. Iz navedenog razloga cilj ovog diplomskog rada bio je procijeniti kvalitetu hrvatskih maslinovih ulja obzirom na sadržaj polifenola te odrediti antioksidativnu aktivnost istih. Sadržaj ukupnih polifenola u analiziranim maslinovim uljima određen je spektrofotometrijskom metodom korištenjem Folin-Ciocalteu reagensa, dok je antioksidativna aktivnost procijenjena DPPH testom. Rezultati istraživanja upućuju na iznimnu kvalitetu hrvatskih maslinovih ulja te se analizirana maslinova ulja mogu smatrati dobrim izvorom polifenolnih sastavnica. Antioksidativna aktivnost ispitivanih maslinovih ulja proporcionalna je izmjerenom sadržaju ovih biološki aktivnih sastavnica.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 35 stranica, 4 slike, 3 tablice i 22 literaturni navod. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: maslinovo ulje, polifenoli, antioksidativna aktivnost, DPPH

Mentor: **Dr. sc. Daniela Amidžić Klarić**, *poslijedoktorandica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Daniela Amidžić Klarić**, *poslijedoktorandica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*  
**Dr. sc. Ana Mornar Turk**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*  
**Dr. sc. Kristina Pavić**, *poslijedoktorandica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*

Rad prihvaćen: kolovoz 2018.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Pharmacy  
Department of Pharmaceutical Analysis  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

# DETERMINATION OF TOTAL POLYPHENOL CONTENT AND ANTIOXIDANT ACTIVITY IN OLIVE OIL

Petra Šarenić

## SUMMARY

The Mediterranean diet rich in olive oil, which is the main source of fat, is a synonym for a healthy diet. The optimal ratio of unsaturated and saturated fatty acids and the antioxidant activity of polyphenols, tocopherols, carotenoids and chlorophylls ensure the beneficial effect of olive oil on human health. Polyphenols as well as other phytochemicals show higher efficacy when taken into the organism through natural sources. Olive oil is a good source of polyphenolic components, which take an important role in the preventive and therapeutic function of this food. The aim of this diploma thesis is to evaluate the quality of Croatian olive oils regarding the proportion of polyphenol and to determine their antioxidant activity. The total content of polyphenols in the analyzed olive oils was determined by spectrophotometric method using Folin-Ciocalteu reagent, while the antioxidant activity was estimated by the DPPH test. The results of the research point to the exceptional quality of Croatian olive oils and that the analyzed olive oils can be considered as a good source of polyphenolic components while the antioxidant activity of the examined olive oils complies with the content of these biologically active constituents.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 35 pages, 4 figures, 3 tables and 22 references. Original is in Croatian language.

Keywords: olive oil, polyphenol, antioxidant activity, DPPH

Mentor: **Daniela Amidžić Klarić, Ph.D.** *Postdoctoral Researcher*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Daniela Amidžić Klarić, Ph.D.** *Postdoctoral Researcher*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Ana Mornar Turk, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Kristina Pavić, Ph.D.** *Postdoctoral Researcher*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: August 2018.